



**PCT**  
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL  
Oficina Internacional  
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

<b>(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>5</sup> :</b>  <b>A61K 39/23, C12N 15/86</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Número de publicación internacional:</b> <b>WO 92/17205</b>  <b>(43) Fecha de publicación internacional:</b> 15 de octubre de 1992 (15.10.92)
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p><b>(21) Solicitud internacional:</b> PCT/ES92/00031</p> <p><b>(22) Fecha de presentación internacional:</b> 26 de marzo de 1992 (26.03.92)</p> <p><b>(30) Datos relativos a la prioridad:</b>            P9100844      26 de marzo de 1991      ES            (26.03.91)</p> <p><b>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):</b>            ERCROS S.A. [ES/ES]; Avda. de la Diagonal, 593-595,            E-08014 Barcelona (ES).</p> <p><b>(72) Inventores; e</b>  <b>(75) Inventores/solicitantes (sólo US) :</b> CORTES VALDES, Ele-            na [ES/ES]; Gasómetro, 12, E-28005 Madrid (ES). VE-            LA OLMO, Carmen [ES/ES]; Antonio Cumella, 29, E-            28030 Madrid (ES). CASAL ALVAREZ, José, Ignacio            [ES/ES]; Avda. Pablo Iglesias, 90, E-28039 Madrid (ES).</p> <p><b>(74) Mandatario:</b> VELASCO CORTIJO, Gonzalo; Vitruvio, 23,            E-28006 Madrid (ES).</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p><b>(81) Estados designados:</b> AT, AT (Patente europea), AU, BB,            BE (Patente europea), BF (Patente OAPI), BG, BJ (Pa-            tente OAPI), BR, CA, CF (Patente OAPI), CG (Patente            OAPI), CH, CH (Patente europea), CI (Patente OAPI),            CM (Patente OAPI), DE, DE (Patente europea), DK,            DK (Patente europea), ES (Patente europea), FI, FR            (Patente europea), GA (Patente OAPI), GB, GB (Paten-            te europea), GN (Patente OAPI), GR (Patente europea),            HU, IT (Patente europea), JP, KP, KR, LK, LU, LU (Pa-            tente europea), MC (Patente europea), MG, ML (Patente            OAPI), MR (Patente OAPI), MW, NL, NL (Patente eu-            ropea), NO, PL, RO, RU, SD, SE, SE (Patente europea),            SN (Patente OAPI), TD (Patente OAPI), TG (Patente            OAPI), US.</p> <p><b>Publicada</b>  <i>Con informe de búsqueda internacional.            Antes de la expiración del plazo previsto para la modifica-            ción de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si            se reciben tales modificaciones.</i></p> </div> </div>		

**(54) Title:** METHOD FOR PRODUCING A SUBUNIT VACCINE AGAINST THE CANINE PARVOVIRUS AND OTHER RELATED VIRUSES

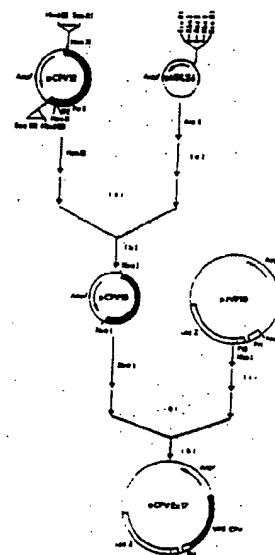
**(54) Título:** PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA VACUNA SUBUNIDAD CONTRA EL PARVOVIRUS CANINO Y OTROS VIRUS RELACIONADOS

**(57) Abstract**

The invention relates to a method for producing a subunit vaccine against canine parvovirus (CPV) and other related viruses (FPLV and MEV). The method is comprised of a first step to obtain a recombinant protein VP2 of CPV using the replication of a recombinant baculovirus, wherein the gene corresponding to the VP2 had been previously introduced in cells of a permissive host. The protein VP2 obtained in this invention has the capacity of forming empty chimeric capsids with high immunogenicity so that they can be formulated into vaccines for protecting animals against infection caused by CPV, FPLV and MEV. Additionally they may be chemically or genetically engineered in order to incorporate epitopes corresponding to other viral proteins and they may be used in the formulation of polyvalent vaccines. The recombinant baculovirus AcMNPV.pCPVEx17 expresses the protein VP2 of the virus CPV in conditions which enable it to form pseudo-viral capsids and has been deposited at the ECACC. Said vaccine finds application in the veterinary field.

**(57) Resumen**

Procedimiento para la producción de una vacuna subunidad contra Parvovirus canino (CPV) y otros virus relacionados (FPLV y MEV). El procedimiento comprende en una primera etapa obtener una proteína recombinante VP2 de CPV utilizando la replicación de un baculovirus recombinante, donde has sido previamente insertado el gen correspondiente a la VP2, en células de un huésped permisivo. La proteína VP2 obtenida en esta invención tiene la capacidad de formar cápsidas quiméricas vacías con alto poder inmunogénico por lo que pueden ser formuladas en vacunas para proteger animales de la infección causada por CPV, FPLV y MEV. Adicionalmente pueden manipularse química o genéticamente para incorporar epítopos correspondientes a otras proteínas virales y utilizarse en la formulación de vacunas polivalentes. El baculovirus recombinante AcMNPV.pCPVEx17 expresa la VP2 de CPV en condiciones que la posibilitan para formar cápsidas pseudo-virales y ha sido depositado en la ECACC. Estas vacunas tienen aplicación en Veterinaria.



**UNICAMENTE PARA INFORMACION**

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	FI	Finlandia	ML	Mali
AU	Australia	FR	Francia	MN	Mongolia
BB	Barbados	GA	Gabón	MR	Mauritania
BE	Bélgica	GB	Reino Unido	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NL	Países Bajos
BG	Bulgaria	GR	Grecia	NO	Noruega
BJ	Benin	HU	Hungría	PL	Polonia
BR	Brasil	IE	Irlanda	RO	Rumania
CA	Canadá	IT	Italia	RU	Federación de Rusia
CF	República Centroafricana	JP	Japón	SD	Sudán
CG	Congo	KP	República Popular Democrática de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KR	República de Corea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Unión Soviética
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	US	Estados Unidos de América
DK	Dinamarca	MG	Madagascar		
ES	España				

## PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA VACUNA SUBUNIDAD CONTRA EL PARVOVIRUS CANINO Y OTROS VIRUS RELACIONADOS

### CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se refiere en general a proteínas virales y a ensayos y vacunas que las utilizan, y en particular a una proteína relacionada con el antígeno mayoritario (VP2) de la cápsida del Parvovirus canino (CPV). Dicha proteína se ha producido en un sistema de expresión de baculovirus multiplicados en un cultivo de células de un huésped permisivo. La proteína obtenida según esta invención tiene la peculiar característica de formar cápsidas quiméricas vacías que pueden ser utilizadas en la formulación de vacunas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El Parvovirus canino (CPV) es un miembro de los parvovirus autónomos, causa enteritis severa en perros de todas las edades y miocarditis en cachorros de menos de 12 semanas de edad. El CPV, se aisló por primera vez en 1978 (*Burtonboy, G. et al., Arch. Virol. 61:1-11, 1979; Appel et al., Vet. Rec. 105. 156-179, 1979*). Se cree que ha surgido como una variante natural del virus de la panleukopenia felina (FPLV) o del virus de la enteritis de visón (MEV). La infección producida por CPV se controla utilizando vacunas convencionales a base de virus vivo o inactivado. Sin embargo, dado que los perros son vacunados antes del embarazo, los anticuerpos maternos pueden bloquear la replicación de las vacunas vivas atenuadas. Los parvovirus autónomos constituyen un buen sistema para la producción de vacunas subunidad recombinantes por varias razones, entre otras:

35

1. Simplicidad estructural de las proteínas de la cápsida (no requieren glicosilación, fosforilación o acetilación).
- 5 2. La respuesta humoral parece controlar adecuadamente la diseminación del virus dada la relativa eficacia de las vacunas inactivadas.

Estudios sobre las secuencias de proteína y de DNA y  
10 estudios serológicos muestran una gran homología antigénica y genética entre CPV, FPLV, MEV y el Parvovirus de mapache (*Tratschin et al., J. Gen. Virol.* 61:33-41, 1982. *Carlsson et al., J. Virol.*, 55, 574-582, 1985. *Parrish et al., Arch. Virol.* 72, 267-278, 1982. *Reed et al., J. Virol.* 62:266-276, 1988). A pesar de esta homología presentan una exquisita  
15 especificidad del huésped "in vivo", aunque "in vitro" todos los virus se replican en células de riñón de gato (*Appel et al., Vet. Rec.* 105, 156-179, 1979. *Tratschin, et al., J. Gen. Virol.*, 61:33-41, 1982). La cápsida de CPV contiene dos proteínas cuyas secuencias de aminoácidos se solapan ampliamente, VP1 (82-84 KDa) y VP2 (67-70 KDa)  
20 (*Paradiso et al J. Gen. Virol.* 39, 800-807, 1982. *Surieraux et al. Arch Virol.*, 82, 233-240, 1984. *J. Gen. Virol.* 62, 113-125, 1982. *Surieraux et al., Arch. Virol.* 82, 233-240, 1984). La cápsida de los parvovirus tiene 22 nm de diámetro y contiene alrededor de 10 copias de VP1 y unas 60 copias de VP2 (*Wobble et al., Biochemistry* 23, 6565-6569, 1984), que pueden estar dispuestas  
25 como homo- y heterodímeros (*Paradiso, J. Virol.*, 46, 94-102, 1983), aunque la estructura precisa de la cápsida es desconocida. En cápsidas llenas (conteniendo DNA), la VP2 se rompe preferencialmente por digestión proteolítica en VP3 de 63-67 KDa (*Paradiso et al, J. Gen. Virol.* 39, 800-807, 1982. *Surleaux et al. Arch. Virol.*, 82, 233-  
30 240, 1984), después del ensamblaje de la cápsida (*Paradiso, J. Virol.* 39, 800-807, 1981).

Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha investigado la inmunogenicidad de diferentes fragmentos de

- las proteínas que componen la cápsida viral del CPV, y como consecuencia de ello se han descrito nuevas vacunas de origen recombinante basadas en la proteína VP2 y en fragmentos de VP2 y VP1. Estos hallazgos se resumen en la
- 5 solicitud de patente española nº 9002074 por: "PRODUCCION DE VACUNAS DE PARVOVIRUS CANINO POR EXPRESION DE POLIPEPTIDOS VIRALES EN *E.coli* O POR SINTESIS QUIMICA", en la que figuran como inventores J.I. Casal y otros.
- 10 Dicha solicitud de patente se relaciona con la expresión de dichos productos en sistemas bacterianos de *E.coli*.

Sin embargo, recientemente se han descrito nuevos sistemas para la producción de proteínas a gran escala basándose en

15 la replicación de baculovirus recombinantes derivados del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) en células de insecto en cultivo. El estado de la técnica con respecto a estos sistemas se resume en dos artículos científicos que son los siguientes:

20

1. LucKow, V.A. & Summers, M.D. (1988). Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* 6, 47-55.
2. J. Vialard et al (1990). Synthesis of the membrane fusion and Hemagglutinin Proteins of
- 25 Measles virus, using a novel baculovirus vector containing the  $\beta$ -galactosidase gene. *J. Virol.* 64, 37-50.

Adicionalmente, en la solicitud de Patente Europea nº 0 341 611 a nombre de Cornell Research Foundation, Inc. y

30 Boyce Thompson Institute for Plant Research, Inc., se describe la obtención de vacunas subunidad contra CPV utilizando un sistema de expresión en baculovirus distinto al utilizado en la presente invención y además en dicha solicitud de Patente Europea no se menciona que las

35 proteínas obtenidas tengan capacidad para formar cápsidas

quiméricas vacías, lo cual constituye una diferencia fundamental con la presente invención ya que la proteína VP2 obtenida según nuestra invención tiene capacidad de formar cápsidas quiméricas vacías. Como consecuencia de lo anterior tienen una capacidad inmunogénica y hemaglutinante claramente superior como se demostrará en la descripción que sigue. Esta capacidad agregante de la proteína VP2 obtenida según nuestra invención tiene la ventaja adicional de que pueden introducirse en dichas cápsidas epítomos correspondientes a otras proteínas virales mediante manipulación genética de los baculovirus recombinantes, o por manipulación química de las propias cápsidas.

La síntesis de la proteína VP2 en un sistema de baculovirus posee ventajas notables sobre la síntesis en *E.coli* tales como, mayor fidelidad en cuanto a identidad de la proteína obtenida, mayor solubilidad del producto obtenido, no resulta necesario el empleo de proteínas de fusión, etc. Estos factores constituyen claramente un adelanto y una mejora en procedimientos para la obtención de vacunas subunidad recombinantes respecto a procedimientos anteriores.

## 25. COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un procedimiento nuevo para la producción de una vacuna subunidad de origen recombinante para la protección de perros contra CPV, de gatos contra FPLV y de visones contra MEV. La nueva vacuna así producida puede contener:

- i) la proteína VP2 de CPV producida en un sistema de expresión de baculovirus multiplicados en un cultivo de células de un huésped permisivo, (en adelante,

para referirnos a esta proteína utilizaremos, opcionalmente la expresión "VP2 de la invención"); o

- ii) cápsidas quiméricas vacías formadas por el ensamblaje  
5 de la VP2 de la invención.

La proteína VP2 de la invención tiene la característica peculiar de formar cápsidas quiméricas vacías, que opcionalmente podrían incorporar epítomos correspondientes  
10 a otras proteínas virales mediante manipulación genética de los baculovirus recombinantes, o manipulación química de las propias cápsidas.

Por consiguiente, la presente invención tiene por objeto  
15 un nuevo procedimiento para la obtención de nuevas vacunas subunidad, mejoradas, capaces de proteger perros, gatos y visones contra las infecciones causadas por CPV, FPLV y MEV respectivamente. Como se ha mencionado antes dichas vacunas pueden contener bien la proteína VP2 de la  
20 invención o bien cápsidas quiméricas vacías formadas por dicha proteína VP2 de la invención ya que dichas cápsidas vacías tienen una alta actividad hemaglutinante y un alto poder inmunogénico, superiores a las de otras proteínas recombinantes de estos virus producidas anteriormente en  
25 cualquier otro sistema. Las nuevas vacunas proporcionadas por esta invención y que constituyen un objeto de la misma pueden contener bien dichas cápsidas vacías junto con un diluyente inmunológicamente aceptable, con o sin adyuvante, bien la proteína VP2 de la invención junto con  
30 un diluyente y un adyuvante.

Dado que dichas cápsidas quiméricas pueden ser manipuladas química o genéticamente para introducir en ellas epítomos correspondientes a otros péptidos o proteínas virales no  
35 relacionadas, el empleo de dichas cápsidas tanto para

fines vacunales contra CPV, FPLV y MEV como el empleo de dichas cápsidas modificadas para incorporar otros epítomos y constituir de este modo una vacuna polivalente también constituyen objetos adicionales de esta invención.

5

La proteína VP2 obtenida según la invención y las cápsidas quiméricas que puede formar pueden ser útiles en diagnóstico para detectar la presencia de anticuerpos específicos del CPV o para inducir anticuerpos policlonales o monoclonales capaces de detectar el CPV. El empleo de la proteína VP2 de la invención y de las cápsidas quiméricas que puede formar para los fines arriba indicados también constituyen otro objeto de la presente invención.

15

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un baculovirus recombinante, y su procedimiento de obtención, capaz de producir una proteína recombinante VP2 de CPV idéntica a la de origen viral como se ha demostrado mediante ensayos de reactividad antigénica y otros ensayos de funcionalidad biológica. El baculovirus recombinante se ha denominado AcMNPV.pCPVEx17 y ha sido depositado el 2.3.91 en la European Collection of Animal Cell Cultures, (ECACC) en Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG (Gran Bretaña) con el nº de acceso V91030212.

25

Un objeto adicional de la invención lo constituye el nuevo vector de transferencia en baculovirus (pCPVEx17) que contiene la secuencia de ácidos nucleicos que codifican para la VP2 de la invención. Este nuevo vector mediante un procedimiento conocido como recombinación homóloga con la cepa salvaje del AcMNPV da lugar al citado baculovirus recombinante AcMNPV.pCPVEx17.

35 Esta invención también proporciona la secuencia de ácidos



nucleicos que codifica para la proteína VP2 obtenida según la invención (figura 1).

Las cápsidas quiméricas vacías de CPV formadas por autoensamblaje de las proteínas VP2 recombinantes de CPV también constituyen un objeto adicional de esta invención.

#### BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

10 La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos que codifica para la VP2 de la invención así como su secuencia de aminoácidos. La secuencia de nucleótidos está indicada en la dirección 5' → 3' de izquierda a derecha. Los aminoácidos se han designado según el código de tres  
15 letras generalmente aceptado.

La figura 2 muestra la construcción del vector de transferencia pCPVEx17 indicando las manipulaciones adecuadas para la inserción del gen de VP2 de CPV en el  
20 plásmido pJVP102.

La figura 3 muestra la presencia de cápsidas quiméricas vacías formadas por agregación de la proteína VP2 de la invención, tal y como se observa al microscopio  
25 electrónico.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona un procedimiento nuevo para la obtención de una vacuna subunidad de origen recombinante adecuada para la protección contra infecciones causadas por el Parvovirus canino o virus relacionados tales como FPLV y MEV. La nueva vacuna puede contener la proteína recombinante VP2 del CPV producida en un sistema de  
35 expresión de baculovirus multiplicados en un cultivo de

**HOJA SUSTITUIDA**

células de lepidóptero u otro huésped permisivo, o cápsidas quiméricas formadas por agregación de dicha VP2 recombinante.

- 5 La invención también proporciona un baculovirus recombinante capaz de expresar la VP2 de CPV cuando se inocula en un huésped permisivo, así como el procedimiento de obtención de dicho baculovirus recombinante. La obtención del baculovirus recombinante comprende
- 10 básicamente las etapas de:

- a) Preparación del gen que codifica para la proteína VP2 del CPV;
- 15 b) inserción del gen de VP2 en un vector de transferencia de baculovirus;
- c) transfección de células huésped permisivas con el citado vector de transferencia de baculovirus que lleva inserto el gen de la VP2; y
- 20 d) selección del baculovirus recombinante que expresa la proteína VP2 del CPV.

Adicionalmente se efectúa la caracterización del baculovirus recombinante obtenido así como la caracterización de las proteínas y cápsidas producidas.

25

Estas etapas se describirán con detalle posteriormente.

- En una realización preferida, el gen que codifica para la proteína VP2 de CPV se prepara de acuerdo con el protocolo
- 30 descrito en la solicitud de patente española nº 9002074 anteriormente citada y se inserta en el sitio *Nhe I* del plásmido pJVP10Z derivado del AcMNPV, con lo que se obtiene un vector de transferencia de baculovirus. En nuestra invención el vector denominado pCPVEx17 demostró
- 35 tener el DNA de CPV en la orientación correcta para su

expresión por el promotor de la polihedrina del virus AcMNPV.

- El vector pCPVEx17 se utilizó para cotransfectar, junto  
5 con el DNA de la cepa silvestre del virus AcMNPV,  
células huésped permisivas. Entre estas células se pueden  
citar células de lepidópteros o sus larvas. En una  
realización preferida de esta invención se transfectaron  
células *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*), generalmente de la cepa  
10 Sf9, con pCPVEx17, aunque resulta obvio suponer que se  
podrían obtener resultados semejantes transfectando otras  
células permisivas para la replicación del baculovirus  
recombinante.
- 15 Efectuada la transfección se seleccionaron los baculovirus  
recombinantes tras retirada y titulación de los  
sobrenadantes producidos en monocapas confluentes de  
células *S. frugiperda*. Las placas azules que no contenían  
evidencia de la polihedrina viral por microscopía óptica  
20 se recogieron y retitularon sobre células *S. frugiperda* para  
obtener los baculovirus recombinantes. El baculovirus  
recombinante denominado AcMNPV.pCPVEx17 es capaz de  
expresar la proteína recombinante VP2 de CPV (VP2 de la  
invención) y se ha depositado en la ECACC con el nº de  
25 accesión V91030212.

Mediante un ensayo de "Dot Blot" se comprobó que el gen de  
la VP2 se había integrado correctamente en el genoma del  
baculovirus recombinante citado.

30

- Las proteínas expresadas por las células *S. frugiperda*  
infectadas con el baculovirus recombinante se analizaron  
por electroforesis en geles de gradiente del 8% al 15% de  
SDS-poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie  
35 observándose la presencia mayoritaria de una proteína con

un peso molecular aparente de 67 KDa, equivalente al de la VP2 viral en el carril correspondiente al virus recombinante. Pruebas de inmunodetección demostraron que los antisueros policlonales anti-CPV reaccionaban con la  
5 VP2 expresada por el baculovirus recombinante. Asimismo se comprobó que anticuerpos monoclonales neutralizantes reconocían también la VP2 recombinante. En base a estos resultados se puede afirmar que la VP2 de la invención expresada por el baculovirus recombinante en células de *S.*  
10 *frugiperda* es antigénicamente indistinguible de la VP2 de origen viral.

La proteína VP2 obtenida según el procedimiento antes descrito puede utilizarse con fines diagnósticos para  
15 detectar la presencia de anticuerpos específicos de CPV o para inducir anticuerpos policlonales o monoclonales capaces de detectar el CPV. Adicionalmente, pueden también utilizarse para inmunizar animales contra CPV y otros virus relacionados. Ensayos ELISA demostraron que  
20 sueros procedentes de animales inmunizados reconocían los antígenos virales mientras que ensayos de inhibición de hemaglutinación (IHA) demostraron que sueros de animales inmunizados con la proteína VP2 purificada obtenida según la presente invención presentaban títulos de IHA iguales  
25 o superiores a los obtenidos con otras vacunas comercialmente disponibles, si bien en algunos casos la respuesta era más rápida y/o considerablemente superior cuando se inmunizaban animales con la VP2 obtenida según nuestro procedimiento (véase tabla I).

30

Adicionalmente se ha podido comprobar que la proteína VP2 de la invención expresada por el baculovirus recombinante AcMNPV.pCPVEx17 induce antisueros capaces de neutralizar el CPV y de proteger monocapas celulares hasta una  
35 dilución 1:2000 equivalente a sueros de animales

hiperinmunizados o recuperados de infecciones naturales.

En base a los resultados obtenidos, la proteína VP2 expresada por el sistema de baculovirus recombinante de la  
5 invención puede ser utilizada para su formulación en vacunas al objeto de proteger animales contra la infección causada por CPV y/o virus relacionados. Estas vacunas pueden ser tanto pasivas como activas. Una vacuna pasiva se podría obtener inmunizando animales con la VP2  
10 recombinante y purificada de la invención y posteriormente aislando anticuerpos policlonales contra dicha VP2 que una vez purificados pueden usarse en aplicaciones terapéuticas o profilácticas. Una vacuna activa puede prepararse resuspendiendo la VP2 de la invención en un diluyente  
15 inmunológicamente aceptable más un adyuvante.

Anteriormente se ha mencionado que la proteína VP2 obtenida según el procedimiento de esta invención tiene la peculiaridad de que puede agregarse, operando según  
20 nuestras condiciones, y formar cápsidas quiméricas vacías pseudo-virales de estructura regular y uniforme y con un tamaño de 22 nm aproximadamente como se ha demostrado por microscopía electrónica. Hasta la fecha nadie ha descrito la formación de cápsidas pseudo-virales, en Parvovirus  
25 canino, "in vitro", usando exclusivamente su proteína VP2. Este hecho permite purificar fácilmente las proteínas VP2 recombinantes obtenidas. Adicionalmente, las cápsidas vacías formadas por el ensamblaje de la VP2 tienen una alta actividad hemaglutinante y un alto poder  
30 inmunogénico, superior al de otras proteínas recombinantes de CPV producidas anteriormente en otros sistemas. Por tanto, dichas cápsidas pueden ser formuladas para su empleo en vacunas capaces de proteger animales contra la infección causada por CPV y/o virus relacionados (FPLV,  
35 MEV). En general, puede prepararse una vacuna activa

- resuspendiendo dichas cápsidas en un diluyente inmunológicamente aceptable con o sin adyuvante. Un aspecto importante de estas cápsidas quiméricas vacías, que puede resultar obvio para una persona experta en esta tecnología, es que pueden ser manipuladas química o genéticamente para introducir epítomos correspondientes a proteínas de otros virus de cuya infección se desea proteger, y actuar por tanto como una vacuna polivalente.
- 10 Como diluyente inmunológicamente aceptable pueden utilizarse soluciones salinas con tampón de fosfato (PBS) u otras soluciones salinas similares. Como adyuvante pueden utilizarse suspensiones de geles de alúmina u otros adyuvantes habitualmente utilizados en la formulación de vacunas.

DESCRIPCION DETALLADA DE UN MODO PREFERIDO DE REALIZACION DE LA INVENCION. (EJEMPLO)

- 20 1. OBTENCION DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES QUE EXPRESAN EL GEN DE LA VP2 DE CPV.

1.1. Preparación del gen de la VP2

- 25 El aislamiento y clonaje del gen que codifica para la VP2, a partir del genoma del parvovirus canino ha sido descrito previamente con detalle en la solicitud de Patente española anteriormente mencionada nº 9002074. En dicha solicitud de patente se describe la construcción de un clon genómico que contiene una copia del genoma de CPV a partir de la cepa atenuada de CPV 780916 (Cornell University) mediante un procedimiento que comprende la clonación del extremo 3', la de la región central y la del extremo 5' en tres plásmidos que posteriormente se digirieron con las enzimas de

restricción adecuadas para aislar los fragmentos del  
genoma de CPV que se aislaron y ligaron entre sí.  
Posteriormente y para facilitar la expresión de los  
genes estructurales se clonó el gen en pUC18 de las  
5 proteínas estructurales y se obtuvo el plásmido pCPV12.

1.2. Inserción del gen de la VP2 en un vector de  
transferencia de baculovirus.

10 El vector plasmídico con sitio *NheI* derivado de AcMNPV  
(plásmido pJVP10Z, *Vialard, J. et al, J. Virol. 64, 37-50, 1990*) fue una  
donación del Dr. Cris Richardson (NRC. Quebec. Canadá)  
y fue usado para clonar el fragmento *XbaI* obtenido de  
pCPV12 tal como se describe en la Figura 2. Como puede  
15 verse en dicha figura, el fragmento *HpaII* del pCPV 12  
que contiene el gen que codifica para la VP2 de CPV se  
clonó en el sitio *AclI* del vector pMTL24 flanqueado por  
2 sitios *XbaI*, dando lugar al plásmido pCPV13.  
Posteriormente el fragmento *XbaI* de dicho plásmido se  
20 insertó en el sitio *NheI* de pJVP10Z. Los plásmidos  
obtenidos que contenían insertado el gen de la VP2  
fueron purificados de acuerdo a la técnica de la lisis  
alcalina (*Bimboim & Doly. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523. 1979*) y  
caracterizados por mapeo con endonucleasas de  
25 restricción. El recombinante llamado pCPVEx17 demostró  
tener el DNA de CPV en la orientación correcta para su  
expresión por el promotor de la polihedrina del virus  
AcMNPV (Fig. 2).

30 1.3. Transfección y selección de virus recombinantes

Células de *S.frugiperda* fueron transfectadas con mezclas del  
DNA infeccioso purificado a partir de AcMNPV y DNA  
plasmídico procedente de pCPVEx17 de acuerdo al

procedimiento descrito por Burand et al. *Virology* 101, 286-290 (1980). DNA de AcMNPV (1  $\mu$ g) purificado por el método de Smith y Summers *Virology* 123, 393-406. 1983, se mezcló con dos cantidades diferentes del DNA plasmídico (1 y 5  $\mu$ g) y se llevó a  
5 750  $\mu$ l con solución salina tamponada con Hepes (25 mM Hepes, pH 7.1, 140 mM NaCl y 125 mM CaCl<sub>2</sub>). La solución de DNA se inoculó sobre monocapas de  $2 \times 10^6$  células de *S.frugiperda* y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. Después se retiró el sobrenadante y se añadieron 5 ml  
10 de medio, conteniendo 10% suero fetal de ternera. Tras 4 días de incubación, los sobrenadantes fueron recogidos y titulados en monocapas confluentes de células *S.frugiperda*. Para mejorar la detección de las placas recombinantes, se añadió a la agarosa el indicador azul  
15 X-gal. Las placas azules que no contenían evidencia de cuerpos de oclusión (polihedrina viral) por microscopía óptica fueron recogidas y retituladas sobre células *S.frugiperda* para obtener los virus recombinantes. Siguiendo un tercer plaqueo, se obtuvieron stocks de los virus  
20 recombinantes con alto título ( $10^{7.5}$  pfu/ml).

El baculovirus recombinante fue llamado AcMNPV.pCPVEx17 y está depositado en la European Collection of Animal  
25 Cell Cultures (ECACC) con el nº de acceso V91030212.

25

## 2. ENSAYO DE DOT BLOT

Para determinar si se había integrado el gen de VP2 en el genoma del baculovirus recombinante se realizó un  
30 ensayo "Dot Blot" según el procedimiento siguiente.

Para obtener DNA a partir del baculovirus recombinante, las células *S.frugiperda* fueron infectadas con dicho virus recombinante a una multiplicidad de infección de 5  
35 PFU/célula y se incubaron a 27°C durante 48 h. Las



células infectadas fueron recogidas, sonicadas y centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min para eliminar restos celulares. El sobrenadante fue utilizado como material de partida para los ensayos.

- 5 Un volumen de 100  $\mu$ l se desnaturalizó con 10  $\mu$ l de NaOH 1M, se hirvió durante 5 min y se colocó inmediatamente sobre hielo. La mezcla se neutralizó con 10  $\mu$ l de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$  1M. Inmediatamente se añadió una  
10 solución 20xSSC hasta obtener una concentración final 6xSSC (SSC, solución salina citrato).

- La solución fue transferida a un filtro de nitrocelulosa previamente humedecido con 6xSSC. Se lavó con más 6xSSC y se secó a 37°C durante 30 min. El DNA  
15 se fijó al filtro de nitrocelulosa con luz U.V. durante 2-3 min. Las membranas se hibridaron entonces con una sonda específica de la región de la VP2 marcada con Fósforo-32 a 37°C durante la noche. Posteriormente se lavó con soluciones decrecientes de SSC y se auto-  
20 rradiografió.

- Se observó una fuerte señal de hibridación sólo en el caso de los pocillos que contenían sobrenadantes procedentes de los cultivos infectados con virus  
25 recombinantes, indicando que el gen de la VP2 se había integrado dentro del genoma viral.

### 3. ANALISIS DE PROTEINA E INMUNODETECCION

- 30 Células *S.frugiperda* fueron infectadas con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de 5 PFU/célula e incubadas a 27°C durante 48 h. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min, se lavaron dos veces con solución salina tamponada  
35 con fosfato (PBS) pH 7.4 y se resuspendieron a  $1 \times 10^6$

células/ml con buffer de lisis (5% dodecil sulfato  
sódico (SDS), 1%  $\beta$ -mercaptoetanol y 17,4% glicerol).  
Las muestras se cargaron en geles de gradiente del 8 al  
15% de SDS-poliacrilamida para electroforesis y se  
5     tiñeron con azul de Coomasie o se transfirieron a  
membranas de nitrocelulosa para la inmunodetección. Por  
tinción con azul de Coomasie se observó la presencia  
mayoritaria de una proteína con un peso molecular  
aparente de 67 KDa, equivalente al de la proteína VP2  
10     viral, en el carril correspondiente al virus  
recombinante.

Para la inmunodetección, las proteínas se transfirieron  
a membranas de nitrocelulosa según técnicas previamente  
15     descritas Burnette, *Anal. Biochem.* 112, 195-203, 1981. Towbin et al., *Proc. Natl. Acad.*  
*Sci. USA* 76, 4350-4354, 1979. La transferencia de proteínas se  
hizo en un aparato PhastSystem (Pharmacia). En general  
se utilizaron 25 mA/gel durante 10-15 minutos. Las  
20     tiras de nitrocelulosa se bloquearon con un 3% de leche  
en polvo desnatada en Tris HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500  
mM (TBS) durante 30 min a temperatura ambiente. A  
continuación las tiras se incubaron durante una hora a  
temperatura ambiente con el primer antisuero anti-CPV  
(antisueros específicos o anticuerpos monoclonales), se  
25     lavaron con TBS-0.05% Tween-20 durante 30 min a  
temperatura ambiente y se incubaron con suero de conejo  
anti-ratón en el caso de utilizar como primer  
anticuerpo anticuerpos monoclonales murinos anti-CPV a  
una dilución 1:1000 durante una hora a temperatura  
30     ambiente o bien con inmunoglobulinas de cabra  
anticonejo marcadas con biotina (1:1000) en el caso de  
usar antisueros de conejo como 1<sup>er</sup> anticuerpo. Las tiras  
se lavaron de nuevo y se dejaron reaccionar bien con  
35     proteína A, marcada con peroxidasa, a una dilución de  
1:1000 durante una hora a temperatura ambiente o bien

5 con estreptavidina-peroxidasa (1:2000) durante 30 min a temperatura ambiente. Después de un lavado extenso, los filtros se revelaron con una solución de TBS conteniendo 0.5 mg/ml de 4-cloro-1-naftol (Sigma), 17% (v/v) de metanol y 0.015% de peróxido de hidrógeno en TBS hasta que aparecieron bandas visibles. La reacción se paró tratando las tiras con agua destilada.

10 En aquellos casos en los cuales las especificidades pudieron ser determinadas por análisis de inmunoblot, todos los antisueros policlonales anti-CPV reaccionaron con la proteína VP2 expresada en baculovirus. El aspecto más importante es que todos los anticuerpos monoclonales neutralizantes que funcionan en este  
15 ensayo reconocen también la VP2 recombinante. Este ensayo demuestra que la proteína VP2 recombinante es antigénicamente indistinguible de la VP2 de origen viral.

20 3.1 Purificación de la proteína recombinante y de las cápsidas

Células de *S.frugiperda* fueron infectadas con virus recombinante AcMNPV.pCPVEx17 a una multiplicidad de  
25 infección de 5-10 PFU/células e incubadas a 27°C durante 48-72 h. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato pH 7.4 y se resuspendieron a  $2 \times 10^7$  células/ml en buffer bicarbonato 25 mM, pH 9.5. Las células resuspendidas se  
30 rompen por sonicación y se centrifugan a 10.000 rpm durante 10 min para eliminar restos celulares. El sobrenadante conteniendo la proteína VP2 recombinante se puede purificar aprovechando su capacidad autoagregante para formar cápsidas vacías. Para ello bien se  
35

purifican por precipitación con sulfato amónico al 20% o bien se centrifugan las cápsidas vacías sobre gradientes de CsCl a 45000 rpm durante 14h. Las cápsidas presentan una densidad de flotación ( $\rho$ ) de 1.30 g/cm<sup>3</sup> cuando se bandean en gradientes de CsCl. La pureza de la preparación se determinó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida según la técnica descrita anteriormente y resultó tener una pureza en proteína VP2 superior al 99%.

10

#### 4. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

La funcionalidad de la proteína recombinante fue analizada por un ensayo de hemaglutinación (HA). Esta actividad viene asociada exclusivamente al carácter particulado del producto, que lo diferencia claramente de otros anteriores. Para ello se mezclan 50  $\mu$ l de una solución conteniendo diversas diluciones de factor dos de un preparado viral con 50  $\mu$ l de una solución conteniendo eritrocitos de cerdo al 1% en tampón fosfato pH 6.5 y se deja a 4°C durante al menos, 4 h en placas de fondo redondo.

20

Los resultados indican que la preparación de cápsidas de VP2 posee un título de HA de 10<sup>5</sup> unidades/ml.

25

#### 5. CONFIRMACION DE LA PRESENCIA DE CAPSIDAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

Una preparación de VP2 purificada fue teñida por contraste negativo con acetato de uranilo al 2% y observada al microscopio electrónico a una magnificación de 40000 x 2.5 aumentos, observándose la presencia de un gran número de partículas quiméricas pseudo-virales, de estructura regular y uniforme y con

35

un tamaño aproximado de 22 nm. (Figura 3)

## 6. INMUNIZACION DE ANIMALES

5 Dos conejos, raza neozelandesa, de 2 Kg de peso, fueron  
inmunizados intramuscularmente tres veces (días 0, 15  
y 30) con 100  $\mu$ g de una preparación de VP2 purificada.  
La 1ª vez en adyuvante completo de Freund, la 2ª y 3ª  
10 con adyuvante incompleto. Una semana después de la  
última inmunización se sangró el conejo y se valoró el  
suero obtenido por un ensayo ELISA, por otro de  
inhibición de la hemaglutinación (IHA) y por otro de  
neutralización de CPV in vitro, tal como se describen  
a continuación.

15

Por otro lado 22 perros Beagle, de 45 días de edad,  
agrupados en 4 lotes se inmunizaron subcutáneamente con  
dos dosis de preparaciones de cápsidas de VP2  
semipurificadas (con  $\beta$ -galactosidasa). La  
20 concentración de proteína se calculó por el ensayo  
Bradford. La dosis de recuerdo se dió 28 días después  
de la 1ª inmunización. El antígeno se adyuvantó con  
Alhydrogel (Superfos. Denmark), Quil A (Superfos) (50  
 $\mu$ g/perro) o una combinación de ambos. Los perros se  
25 sangraron dos veces a la semana hasta dos meses después  
de la última inyección. Dos perros se inmunizaron con  
una vacuna comercial inactivada. Como control negativo  
se usó un perro centinela para chequear cualquier  
exposición accidental a CPV.

30

Los resultados se recogen en la tabla I. Los perros en  
el grupo I recibieron 100  $\mu$ g de cápsidas de VP2 por  
inoculación. Los grupos II, III y IV recibieron 50, 25  
y 10  $\mu$ g, respectivamente, por inmunización.

35

La presencia de anticuerpos en los sueros de los perros se determinó por un ensayo de ELISA y por su capacidad para inhibir la HA viral, según un procedimiento que se describe posteriormente. Todos los perros inmunizados con nuestro antígeno exhibieron anticuerpos anti-CPV a varios niveles con las diferentes combinaciones de adyuvantes estudiadas (Tabla I). Sin embargo, los títulos más altos de anticuerpos se obtuvieron cuando se usó Quila, solo o en combinación con Alhydrogel. Esta combinación fue más efectiva con dosis bajas (10  $\mu$ g) de cápsidas VP2.

Se usaron ensayos de IHA y de neutralización para evaluar la capacidad de estas preparaciones para inducir protección en perros contra el CPV. Pollock y Carmichael (*Cornell Vet. J.* 72: 16-35, 1982) mostraron previamente que hay una buena correlación entre título de IHA y protección; perros que muestren títulos de IHA > 80 se consideran refractarios a la infección por CPV. Todos los perros vacunados con nuestra preparación mostraron altos títulos de IHA, entre 150 y 5.120 (Tabla I). Títulos de IHA suficientes persistieron durante más de 2 meses. Se encontró una buena correlación entre títulos de IHA y neutralización por protección de monocapa. En ambos casos, los títulos obtenidos son muy superiores, incluso a bajas dosis (10  $\mu$ g/perro), a aquéllos necesarios para obtener una respuesta protectora en perros. Los títulos fueron similares a aquéllos obtenidos con sueros de perros recuperados de una infección de parvovirus y mucho más altos que aquéllos obtenidos con el control vacunado. No se detectaron anticuerpos anti-CPV en el suero de los perros no inoculados.

## A) ELISA

5 La presencia de anticuerpos específicos para CPV en el suero de los animales inmunizados fue determinada mediante un ensayo de ELISA indirecto. Como antígeno se utilizó tanto virus purificado, como proteína VP2 purificada. Brevemente, placas de poliestireno se recubrieron con 0.5  $\mu$ g de virus o 0.25  $\mu$ g/pocillo de VP2 en 100  $\mu$ l de buffer carbonato (0.05 M, pH 9.6) a 4°C durante la noche. 10 Las placas se lavaron con PBS (NaCl 0.15 M en fosfato sódico 0.1 M pH 7.4) conteniendo 0.05% Tween-20 y se incubaron con el antisuero durante 2h a 37°C, se lavaron de nuevo y se incubaron bien con IgG de cabra anti-conejo marcado con biotina, 15 en el caso de los sueros de conejo, bien con proteína A marcada con peroxidasa en el caso de los sueros de perro durante 1 h a temperatura ambiente. En el caso del anticuerpo marcado con biotina se incubó posteriormente con estreptavidina marcada 20 con peroxidasa durante 30 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y la reacción se reveló con o-fenilendiamina como sustrato para la peroxidasa, durante 10 min en 25 oscuridad y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro multicanal. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

30 En el caso de los sueros procedentes de conejos, el título obtenido por ELISA fue de 1/6400 frente al virus completo.

35 En el caso de los sueros procedentes de perros, los antisueros reconocían perfectamente el antígeno viral en un ensayo de ELISA con títulos frente al

virus completo de hasta  $1/5120$  para la dosis de  $100 \mu\text{g}$ .

B) INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (IHA)

5

Se inactivan los sueros a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y se absorben con Kaolín 0.25% durante 1h, a temperatura ambiente y se efectúan diluciones (factor dos) de los sueros procedentes de los  
10 perros inmunizados, en tampón fosfato pH 6.5, empezando por la dilución 1:20. Se mezclan  $25 \mu\text{l}$  de cada una de las diluciones anteriores con  $25 \mu\text{l}$  de una dilución de virus conteniendo 4 unidades de HA. Se incuba durante 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación se  
15 añaden  $50 \mu\text{l}$  de eritrocitos de cerdo al 1% en tampón fosfato pH 6.5 y se deja a  $4^{\circ}\text{C}$  durante al menos, 4 h en placas de fondo redondo.

C) NEUTRALIZACION DE CPV "in vitro"

20

La neutralización se determinó mediante un experimento de protección de monocapa. Brevemente, una cantidad conocida de CPV (100 unidades de HA) se incubó con antisuero de conejo a diferentes  
25 diluciones durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las muestras se inocularon sobre monocapas de células susceptibles CRFK durante 90 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las monocapas se cubrieron con 1 ml de agarosa al 1% en medio fresco. A los 5 días post infección se  
30 fijaron las células con formaldehído al 10% en PBS durante 20 minutos, se retiró la agarosa y las células remanentes se tiñeron con cristal violeta al 1% en etanol al 50% durante 20 minutos. El nivel de protección se evaluó por "screening" visual de  
35 las monocapas infectadas.



El antisuero de conejo inducido por la proteína procedente del plásmido pCPVEx17 es capaz de proteger la monocapa celular de la infección hasta una dilución 1:2000, equivalente a sueros procedentes de animales hiperinmunizados o recuperados de infecciones naturales.

TABLA I

TITULO DE IHA DE PERROS INOCULADOS CON PARTICULAS DE VP2 RECOMBINANTES

Titulo de IHA en perros inmunizados con \*

Días	NC <sup>a</sup>	VAC <sup>c</sup>	I (100 g)		II (50 g)		III (25 g)		IV (10 g)	
			Quila + Alum	Alum	Quila + Alum	Alum	Quila + Alum	Alum	Quila + Alum	Alum
0	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20
7	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20
10	≤20	≤20	50	120	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20
18	≤20	40	160	240	25	25	50	50	25	≤20
35	≤20	320	3000	1500	≤20	≤20	25	25	≤20	≤20
40	≤20	640	2000	2000	1200	600	600	3000	≤20	≤20
49	≤20	200	1600	ND <sup>d</sup>	600	600	1200	300	800	80
56	≤20	50	400	ND	300	75	500	100	600	150
62	≤20	50	400	ND	200	25	250	25	300	50
						≤20	125	125	250	25
									75	≤20

- a) Todos los perros se inocularon en los días 0 y 28 con la dosis y el adyuvante indicados. Cada valor representa el valor promedio para dos perros inoculados en las mismas condiciones
- b) Control negativo
- c) Perro vacunado con una vacuna inactivada comercial
- d) No hecho

# 7. PROTECCION DE PERROS INMUNIZADOS CON CAPSIDAS DE VP2 DE LA INFECCION POR VIRUS CPV VIRULENTO

5 Para determinar la capacidad de las partículas recombinantes de VP2 para inducir protección en perros, seis perros fueron infectados 6 semanas después de la inyección de recuerdo con 1 ml de heces de perro infectadas con CPV virulento, diluidas dos veces en tampón PBS por inoculación oronasal. Las  
10 manifestaciones clínicas de la enfermedad se monitorizaron durante 17 días post-infección. Desde el día 3 post-infección, se registraron diariamente las temperaturas rectales. Las muestras de sangre se recogieron a intervalos y se chequearon para la  
15 presencia de anticuerpos contra el virus y para viremia por HA e infección de cultivos celulares susceptibles (Tabla II). El virus recuperado de las heces de los perros fue identificado como CPV por hemaglutinación. Todos los perros inmunizados con el antígeno viral  
20 fueron inmunes a la infección viral. Ninguno de ellos desarrolló ningún síntoma clínico de enfermedad o viremia demostrable. Sin embargo el perro centinela y el vacunado mostraron una gran respuesta humoral indicativa de replicación viral.

25

Dada la significativa relación genética e inmunológica entre CPV, el virus de la panleucopenia felina (gatos) y el virus de la enteritis de los visones (visones), es razonable pensar que las mismas partículas VP2 serán  
30 utilizables para inmunizar gatos y visones contra parvovirus, como ocurre en el caso de las vacunas convencionales.

35

## TABLA II

## TITULO DE IHA DE PERROS ESTIMULADOS CON CPV VIRULENTO

5

		<u>Días post-challenge</u>			
		<u>0</u>	<u>7</u>	<u>10</u>	<u>17</u>
10	1	-	400	3200	1600
	2	-	1600	3200	1600
	3	400	400	400	400
	4	400	400	400	400
	5	400	200	200	200
15	6	400	200	200	200

Los perros utilizados en el experimento de challenge se  
 20 inmunizaron como sigue: 1. Perro centinela. 2. Perro  
 vacunado con una vacuna comercial inactivada. 3. Perro  
 vacunado con 50  $\mu$ g de VP2 adyuvantada con Quila. 4. Perro  
 vacunado con 50  $\mu$ g de VP2 adyuvantada con alúmina más  
 Quila. 5. Perro vacunado con 25  $\mu$ g de VP2 adyuvantada  
 25 con alúmina más Quila. 6. Perro vacunado con 10  $\mu$ g de  
 VP2 adyuvantado con alúmina más Quila.

## 8. FORMULACION DE LA VACUNA

5 Se puede obtener una vacuna pasiva inmunizando animales con las cápsidas de VP2 recombinante purificada como se describe en la presente invención. Anticuerpos policlonales dirigidos contra esta VP2, pueden aislarse de suero, leche u otros flúidos corporales del animal. Estos anticuerpos pueden ser posteriormente purificados y usados para aplicaciones terapéuticas o profilácticas.

10

Una vacuna activa puede ser preparada resuspendiendo las cápsidas de VP2 recombinante descrita en la presente invención en un diluyente inmunológicamente aceptable tal como PBS, más un adyuvante tal como Alhydrogel o Quila. Inyecciones iniciales y de recuerdo o administración oral de la solución vacunal pueden ser utilizadas para conferir inmunidad.

15

Una vacuna activa puede ser también preparada resuspendiendo las cápsidas vacías en un diluyente inmunológicamente aceptable con o sin adyuvante. Resulta evidente para cualquier persona experta en el arte que estas cápsidas quiméricas formadas exclusivamente por VP2 pueden ser manipuladas química o genéticamente para introducir epítomos correspondientes a otras proteínas virales y actuar por tanto como vacuna polivalente.

20

25

## 9. CONCLUSIONES

30 El baculovirus AcMNPV.pCPVEx17 es capaz de producir una VP2 recombinante completamente idéntica a la proteína VP2 viral como se ha demostrado por secuencia del DNA, estimación de su peso molecular y caracterización antigénica. La VP2 obtenida en esta invención de acuerdo a nuestro procedimiento, posee asimismo la

35

- extraordinaria capacidad de formar cápsidas vacías, lo que le confiere una actividad hemaglutinante e inmunogénica claramente superior a la de otras proteínas recombinantes previamente descritas, como se ha
- 5 demostrado en los experimentos de inmunización de animales aquí descritos.

- Esta alta capacidad inmunogénica puede ser utilizada por personas expertas en el arte para presentar epítopos
- 10 correspondientes a otras proteínas virales, que se pueden introducir en ellas bien por manipulación química o bien por manipulación genética de los baculovirus recombinantes.

15 Traducción de las leyendas de las figuras.

Figura 2

- (a) Aislar fragmentos en gel de agarosa.  
(b) Ligar.  
(c) Fosfatasa.

20

Descrito el objeto de la presente invención se declara que lo que constituye la esencialidad de la misma es lo que se menciona en las siguientes.

## REIVINDICACIONES

1. Vacuna sub-unidad recombinante para proteger perros, gatos y visones contra la infección causada por CPV, FPLV y MEV que comprende:
  - 5 a) una cantidad inmunizante de cápsidas quiméricas vacías formadas por autoensamblaje de proteínas VP2 recombinantes de CPV; y
  - 10 b) un diluyente , y, opcionalmente, un adyuvante, inmunológicamente aceptables.
2. Vacuna según la reivindicación 1, caracterizada porque dichas cápsidas quiméricas vacías han sido  
15 obtenidas por autoensamblaje de las proteínas VP2 recombinantes de CPV producidas durante la replicación, en células de insecto permisivas, de un baculovirus recombinante que tiene integrado en su  
20 genoma el gen que codifica para la proteína VP2 recombinante de CPV.
3. Vacuna según la reivindicación 2, caracterizada porque dicho baculovirus recombinante ha sido denominado AcMNPV.pCPVEx17 y ha sido depositado en la  
25 ECACC con el nº de accesoión V91030212.
4. Vacuna polivalente para proteger animales de la infección causada por CPV, FPLV, MEV y otros virus, que comprende:
  - 30 a) una cantidad inmunizante de cápsidas quiméricas vacías formadas por autoensamblaje de proteínas VP2 recombinantes de CPV manipuladas químicamente para introducir en ellas epítomos  
35 correspondientes a péptidos o proteínas de virus

de cuya infección se desea proteger; y

- b) un diluyente , y, opcionalmente, un adyuvante, inmunológicamente aceptables.

5

5. Vacuna según la reivindicación 4, caracterizada porque dichas cápsidas quiméricas vacías han sido obtenidas por autoensamblaje de las proteínas VP2 recombinantes de CPV producidas durante la replicación, en células de insecto permisivas, de un baculovirus recombinante que tiene integrado en su genoma el gen que codifica para la proteína VP2 recombinante de CPV.

- 15 6. Vacuna según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho baculovirus recombinante ha sido denominado AcMNPV.pCPVEx17 y ha sido depositado en la ECACC con el nº de acceso V91030212.

- 20 7. Vacuna polivalente para proteger animales de la infección causada por CPV, FPLV, MEV y otros virus que comprende:

- 25 a) una cantidad inmunizante de cápsidas quiméricas vacías formadas por autoensamblaje de proteínas VP2 recombinantes de CPV que contienen además los epítomos correspondientes a péptidos o proteínas de virus de cuya infección se desea proteger; y

- 30 b) un diluyente , y, opcionalmente, un adyuvante, inmunológicamente aceptables.

8. Vacuna según la reivindicación 7, caracterizada porque dichas cápsidas quiméricas vacías conteniendo epítomos de proteínas o péptidos virales han sido
- 35



obtenidas por:

- 5 a) manipulación genética de un baculovirus recombinante que tiene integrado en su genoma el gen que codifica para la VP2 de CPV al que se le han introducido dichos epítomos;
  - 10 b) infección de células de insecto permisivas con dicho baculovirus recombinante genéticamente manipulado; y
  - 15 c) cultivo de las células infectadas bajo condiciones que permiten la producción de las cápsidas quiméricas de VP2 genéticamente manipuladas que incorporan los epítomos virales correspondientes.
- 20 9. Vacuna según la reivindicación 9, caracterizada porque dicho baculovirus recombinante susceptible de ser manipulado genéticamente para introducir epítomos virales ha sido denominado AcMNPV.pCPVEx17 y ha sido depositado en la ECACC con el nº de accesoión V91030212.
- 25 10. Cápsidas quiméricas vacías de CPV caracterizadas porque han sido obtenidas por autoensamblaje de proteínas VP2 recombinantes de CPV expresadas en células permisivas de insecto infectadas con un baculovirus recombinante que tiene el gen que
- 30 codifica para la proteína VP2 de CPV.
- 35 11. Cápsidas según la reivindicación 10 caracterizadas porque tienen alta capacidad hemaglutinante y un alto poder inmunogénico por lo que son adecuadas para su empleo en la formulación de vacunas sub-unidad y

polivalentes.

12. Cápsidas según la reivindicación 10, caracterizadas porque dicho baculovirus recombinante capaz de  
5 expresar las proteínas VP2 recombinantes de CPV ha sido denominado AcMNPV.pCPVEx17 y ha sido depositado en la ECACC con el nº de accesoión V91030212.
13. Baculovirus recombinante capaz de expresar proteínas  
10 VP2 recombinantes de CPV en células permisivas, que son capaces de autoensamblarse para formar cápsidas quiméricas vacías.
14. Secuencia de ADN recombinante que codifica para la  
15 proteína VP2 recombinante de CPV que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la figura 1.

1/7

FIGURA 1

CPVVP2      5' → 3'

ATG AGT GAT GGA GCA GTT CAA CCA GAC GGT GGT CAA CCT GCT GTC AGA AAT GAA AGA GCT  
 Met Ser Asp Gly Ala Val Gln Pro Asp Gly Gly Gln Pro Ala Val Arg Asn Glu Arg Ala  
 30 60

ACA GGA TCT GGG AAC GGG TCT GGA GGC GGT GGT GGT GGT TCT GGG GGT GTG GGG ATT  
 Thr Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Gly Ile  
 90 120

TCT ACG GGT ACT TTC Phe Asn Asn Gln Thr Gln Thr Gln Phe Lys Phe Leu Glu Asn Gly Trp Val Glu  
 Ser Thr Gly Thr Phe Asn Asn Gln Thr Gln Thr Gln Phe Lys Phe Leu Glu Asn Gly Trp Val Glu  
 150 180

ATC ACA GCA AAC TCA AGC AGA CTT GTA CAT TTA AAT ATG CCA GAA AGT GAA AAG GAT AGA  
 Ile Thr Ala Asn Ser Ser Arg Leu Val His Leu Asn Met Pro Glu Ser Glu Lys Asp Arg  
 210 240

AGA GTG GTT GTA AAT AAT ATG GAT AAA ACT GCA GTT AAC GGA AAC ATG GCT TTA GAT GAT  
 Arg Val Val Val Asn Asn Met Asp Lys Thr Thr Ala Val Asn Gly Asn Met Ala Leu Asp Asp  
 270 300

ATT CAT GCA CAA ATT GTA ACA CCT TGG TCA TTG GTT GAT GCA AAT GCT TGG GGA GTT TGG  
 Ile His Ala Gln Ile Val Thr Pro Trp Ser Leu Val Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp  
 330 360

TTT AAT CCA GGA GAT TGG CAA CTA ATT GTT AAT ACT ATG AGT GAG TTG CAT TTA GTT AGT  
 Phe Asn Pro Gly Asp Trp Gln Leu Ile Val Asn Thr Met Ser Glu Leu His Leu Val Ser  
 390 420

HOJA SUSTITUIDA

2/7

FIGURA 1 (cont.)

TTT GAA CAA GAA ATT TTT AAT GTT GTT TTA AAG ACT GTT TCA GAA TCT GCT ACT CAG CCA Phe Glu Gln Glu Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Val Ser Glu Ser Ala Thr Gln Pro	450	480
CCA ACT AAA GTT TAT AAT AAT GAT TTA ACT GCA TCA TTG ATG GTT GCA TTA GAT AGT AAT Pro Thr Lys Val Tyr Asn Asp Leu Thr Ala Ser Leu Met Val Ala Leu Asp Ser Asn	510	540
AAT ACT ATG CCA TTT ACT CCA GCA GCT ATG AGA TCT GAG ACA TTG GGT TTT TAT CCA TGG Asn Thr Met Pro Phe Thr Pro Ala Ala Met Arg Ser Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp	570	600
AAA CCA ACC ATA CCA ACT CCA TGG AGA TAT TTT CAA TGG GAT AGA ACA TTA ATA CCA Lys Pro Thr Ile Pro Thr Pro Thr Arg Tyr Tyr Phe Gln Trp Asp Arg Thr Leu Ile Pro	630	660
TCT CAT ACT GGA ACT AGT GGC ACA CCA ACA AAT ATA TAC CAT CAT GGT ACA GAT CCA GAT GAT Ser His Thr Gly Thr Ser Gly Thr Pro Thr Asn Ile Tyr His Gly Thr Asp Pro Asp Asp	690	720
GTT CAA TTT TAT ACT ATT GAA AAT TCT GTG CCA GTA CAC TTA CTA AGA ACA GGT GAT GAA Val Gln Phe Tyr Thr Thr Ile Glu Asn Ser Val Pro Val His Leu Leu Arg Thr Gly Asp Glu	750	780
TTT GCT ACA GGA ACA TTT TTT TTT TTT TGT AGA CTA ACA CAT ACA TGG CAA Phe Ala Thr Gly Thr Phe Phe Phe Asp Cys Lys Pro Cys Arg Leu Thr His Thr Trp Gln	810	840

HOJA SUSTITUIDA

3/7

FIGURA 1 (cont.)

ACA AAT AGA GCA TTG GGC TTA CCA CCA TTT CTA AAT TCT TTG CCT CAA TCT GAA GGA GCT	870	900
Thr Asn Arg Ala Leu Gly Leu Pro Pro Phe		Gly Ala
ACT AAC TTT GGT GAT ATA GGA GTT CAA CAA GAT AAA AGA CGT GGT GTA ACT CAA ATG GGA	930	960
Thr Asn Phe Gly Asp Ile Gly Val Gln Gln Asp Lys Arg Arg Gly Val Thr Gln Met Gly		
AAT ACA AAC TAT ATT ACT GAA GCT ACT ATT ATG AGA CCA GCT GAG GTT GGT TAT AGT GCA	990	1020
Asn Thr Asn Tyr Ile Thr Glu Ala Thr Ile Met Arg Pro Ala Glu Val Gly Tyr Ser Ala		
CCA TAT TAT TCT TTT GAG GCG TCT ACA CAA GGG CCA TTT AAA ACA CCT ATT GCA GCA GGA	1050	1080
Pro Tyr Tyr Ser Phe Glu Ala Ser Thr Gln Gly Gly Pro Phe Lys Thr Pro Ile Ala Ala Gly		
CGG GGG GGA GCG CAA ACA TAT GAA AAT CAA GCA GCA GAT GGT GAT CCA AGA TAT GCA TTT	1110	1140
Arg Gly Gly Ala Gln Thr Tyr Glu Asn Gln Ala Ala Asp Gly Asp Pro Arg Tyr Ala Phe		
GGT AGA CAA CAT GGT CAA AAA ACT ACC ACA ACA GGA GAA ACA CCT GAG AGA TTT ACA TAT	1170	1200
Gly Arg Gln His Gly Gln Lys Thr Thr Thr Thr Gly Glu Thr Pro Glu Arg Phe Thr Tyr		
ATA GCA CAT CAA GAT ACA GGA AGA TAT CCA GAA GGA GAT TGG ATT CAA AAT ATT AAC TTT	1230	1260
Ile Ala His Gln Asp Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Gly Asp Trp Ile Gln Asn Ile Asn Phe		

4/7

FIGURA 1 (cont.)

AAC CTT CCT GTA ACG AAT GAT AAT GTA TTG CTA CCA ACA GAT CCA ATT GGA GGT AAA ACA Asn Leu Pro Val Thr Asn Asp Asn Val Leu Leu Pro Thr Asp Pro Ile Gly Gly Lys Thr	1290				1320
GGA ATT AAC TAT ACT AAT ATA TTT AAT ACT TAT GGT CCT TTA ACT GCA TTA AAT AAT GTA Gly Ile Asn Tyr Thr Asn Ile Phe Asn Thr Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Leu Asn Asn Val	1350				1380
CCA CCA GTT TAT CCA AAT GGT CAA ATT TGG GAT AAA GAA TTT GAT ACT GAC TTA AAA CCA Pro Pro Val Tyr Pro Asn Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Phe Asp Thr Asp Leu Lys Pro	1410				1440
AGA CTT CAT GTA AAT GCA CCA TTT GTT TGT CAA AAT AAT TGT CCT CCT GGT CAA TTA TTT GTA Arg Leu His Val Asn Ala Pro Phe Val Cys Gln Asn Asn Cys Pro Gly Gln Leu Phe Val	1470				1500
AAA GTT GCG CCT AAT TTA ACA AAT GAA TAT GAT CCT GAT GCA TCT GCT AAT ATG TCA AGA Lys Val Ala Pro Asn Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Pro Asp Ala Ser Ala Asn Met Ser Arg	1530				1560
ATT GTA ACT TAC TCA GAT TTT TGG TGG AAA GGT AAA TTA GTA TTT AAA GCT AAA CTA AGA Ile Val Thr Tyr Ser Asp Phe Trp Trp Lys Gly Lys Leu Val Phe Lys Ala Lys Leu Arg	1590				1620
GCC TCC CAT ACT TGG AAT CCA ATT CAA CAA ATG AGT ATT AAT GTA GAT AAC CAA TTT AAC Ala Ser His Thr Trp Asn Pro Ile Gln Gln Met Ser Ile Asn Val Asp Asn Gln Phe Asn	1650				1680

5/7

## FIGURA 1 (cont.)

1710  
 TAT GTA CCA AGT AAT ATT GGA GGT ATG AAA ATT GTA TAT GAA AAA TCT CAA CTA GCA CCT  
 Tyr Val Pro Ser Asn Ile Gly Met Lys Ile Val Tyr Glu Lys Ser Gln Leu Ala Pro

1740  
 AGA AAA TTA TAT TA  
 Arg Lys Leu Tyr

6/7

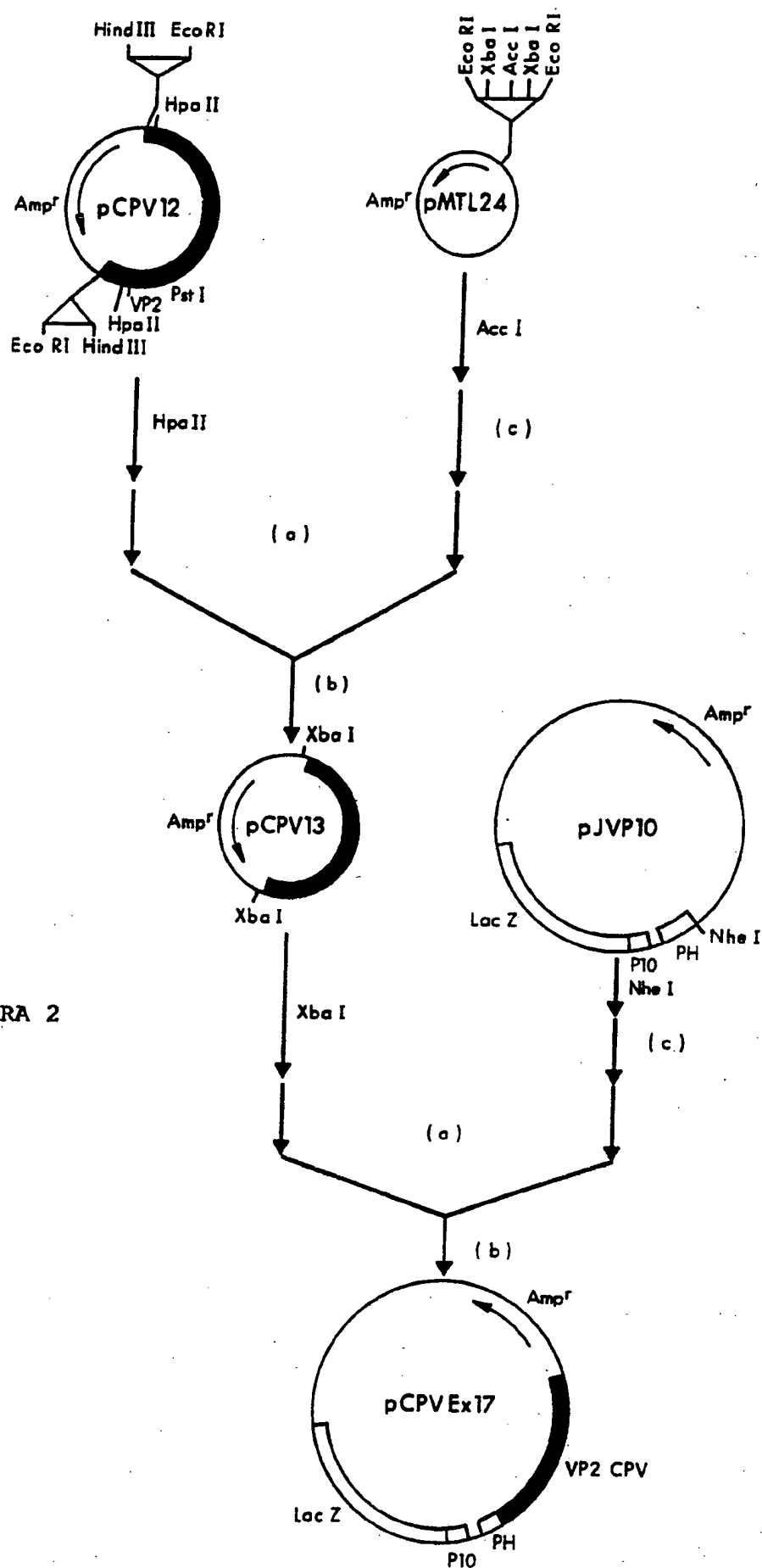


FIGURA 2



7/7

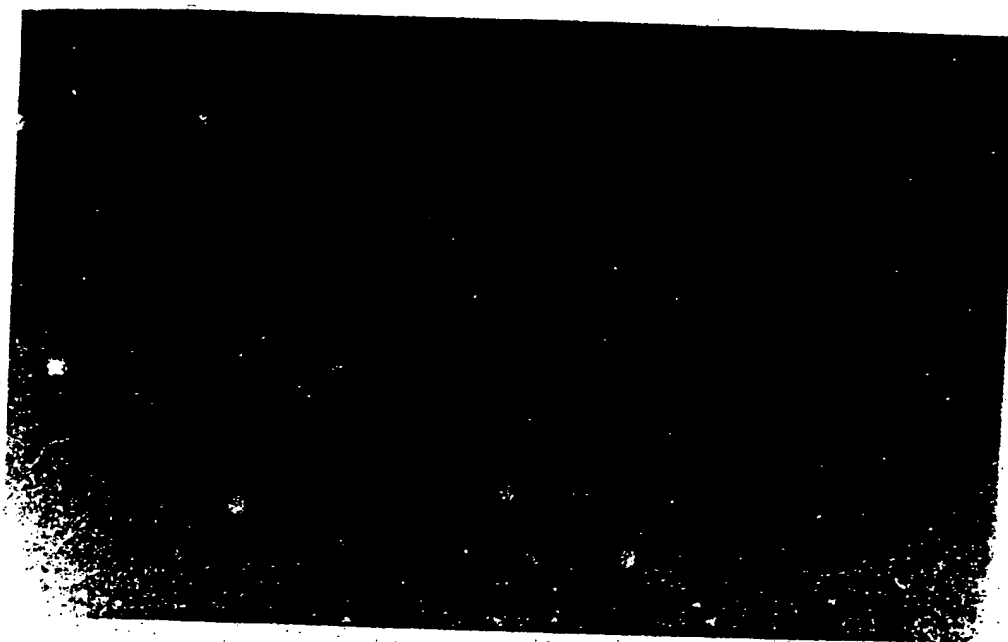


Figura 3

HOJA SUSTITUIDA

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES92/00031

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>5</sup> : A61K 39/23 C12N 15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>5</sup> : C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A, 8802026 (APPLIED BIOTECHNOLOGY INC.) 24 March, 1988, see page 4, paragraph 3 - page 6, paragraph 2; page 11, last paragraph - page 13, first paragraph; page 20, last paragraph - page 21, first paragraph; claims 1-15	1,13
A	---	2,3,10-12
X	The Journal of General Virology, volume 71, No. 11, November 1990, Soc. for General Microbiology, (GB) J.C. Martyn et al.: "Nucleotide sequence of feline panleukopenia virus; comparison with canine parvovirus identifies host-specific differences", pages 2747-2753, see abstract; figure 2	14
A	WO, A, 9005538 (THE USA, The Secretary, US Department of Commerce) 31 May 1990, see page 3, lines 15-28; page 4, lines 10-20; page 5, line 11 - page 7, line 1; page 8, lines 3-10; page 9, lines 2-12	1-3,10,13
A	EP, A, 0341611 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 15 November 1989, see page 2, lines 4-9; page 3, lines 18-58	1-3,13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 June 1992 (15.06.92)Date of mailing of the international search report  
26 August 1992 (26.08.92)Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. .  
PCT/ES92/00031

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	(cited in the application)	1-3,13
	<p>—</p> <p>The Journal of General Virology, volume 73, No.2, February 1992, Soc. for General Microbiology (GB) J.T. Saliki et al.: "Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunozation of dogs", pages 369-374, see abstract; pages 369, right-hand column, last paragraph - page 371, left-hand column , paragraph 3; page 373, left-hand column , paragraph 2; page 373, right-hand column, paragraph 2</p> <p>—</p>	1,2,10-12

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

ES 9200031  
SA 58355

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 02/07/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8802026	24-03-88	AU-A- 7966987	07-04-88
		EP-A- 0322417	05-07-89
		JP-T- 1503675	14-12-89
WO-A- 9005538	31-05-90	AU-A- 4661389	12-06-90
		CA-A- 2002839	14-05-90
		EP-A- 0441897	21-08-91
EP-A- 0341611	15-11-89	US-A- 4971793	20-11-90

**I. CLASIFICACION DE LA INVENCION** (caso de ser aplicables varios símbolos de clasificación, indicarlos todos) <sup>6</sup>

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP  
 CIP.5 A 61 K 39/23 C 12 N 15/86

**II. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA**Documentación mínima consultada <sup>7</sup>

Sistema de clasificación	Símbolos de clasificación
CIP.5	C 07 K C 12 N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda <sup>8</sup>

**III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES <sup>9</sup>**

Categoría *	Identificación de los documentos citados, <sup>11</sup> con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes <sup>12</sup>	Nº de las reivindicaciones a las que se refieren <sup>13</sup>
X	WO,A,8802026 (APPLIED BIOTECHNOLOGY INC.) 24 Marzo 1988, ver página 4, párrafo 3 - página 6, párrafo 2; página 11, último párrafo - página 13, primer párrafo; página 20, último párrafo - página 21, primer párrafo; reivindicaciones 1-15	1,13
A	---	2,3,10-12
X	The Journal of General Virology, volumen 71, num. 11, Noviembre 1990, Soc. for General Microbiology, (GB) J.C. Martyn et al.: "Nucleotide sequence of feline panleukopenia virus; comparison with canine parvovirus identifies host-specific differences", páginas 2747-2753, ver resumen; figura 2 --- -/-	14

\* Categorías especiales de documentos citados: <sup>10</sup>

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente  
 "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma  
 "L" documento que pueda plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)  
 "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio  
 "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de prioridad y que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención  
 "X" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse como nueva ni que implique una actividad inventiva  
 "Y" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia  
 "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

**IV. CERTIFICACION**

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

15-06-1992

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

26.08.92

Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA EUROPEA DE PATENTES

Firma del funcionario autorizado

MONTERO LOPEZ B.

## III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES (CONTINUACION DE LOS DATOS INDICADOS EN LA SEGUNDA HOJA)

Categoría *	Identificación de los documentos citados, con indicación, en caso necesario, de los países pertinentes	Nº de las reivindicaciones a las que se refieran
A	WO,A,9005538 (THE USA, The Secretary, US Department of Commerce) 31 Mayo 1990, ver página 3, líneas 15-28; página 4, líneas 10-20; página 5, línea 11 - página 7, línea 1; página 8, líneas 3-10; página 9, líneas 2-12 ---	1-3,10,13
A	EP,A,0341611 (BOYCE THOMPSON INSTITUTE FOR PLANT RESEARCH, INC.) 15 Noviembre 1989, ver página 2, líneas 4-9; página 3, líneas 18-58 (citado en la solicitud) ---	1-3,13
P,X	The Journal of General Virology, volumen 73, num. 2, Febrero 1992, Soc. for General Microbiology (GB) J.T. Saliki et al.: "Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunozation of dogs", páginas 369-374, ver resumen; página 369, columna derecha, ultimo párrafo - página 371, columna izquierda, párrafo 3; página 373, columna izquierda, párrafo 2; página 373, columna derecha, párrafo 2 -----	1,2,10-12